

ارزیابی ارزش روش‌های تشخیصی سرولوژیک ایمنوفلورسانس غیر مستقیم و الیزا در مقایسه با آزمایش مستقیم و کشت در تشخیص ولوواژینیت کاندیدیایی

مینا شریفی سرخه‌ریزی: کارشناس ارشد قارچ شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران minasharifi62@yahoo.com
 *دکتر مهربان فلاحتی: دانشیار و متخصص قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. (*نویسنده مسئول) mehrabanfalahati@yahoo.com
 دکتر فریده زینی: استاد و متخصص قارچ شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران fzaini@tums.ac.ir
 دکتر لامع اخلاقی: دانشیار و متخصص انگل شناسی، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. z_razi_lab@yahoo.com
 دکتر فریبا حدیری کهن: متخصص بیماری‌های زنان و زایمان، بیمارستان لولاگر، تهران، ایران. dr_heidarie@yahoo.com
 محسن غلمان: کارشناس علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. mohsen_ghelmn@yahoo.com
 سمیه شریفی نیا: کارشناس ارشد قارچ شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. ssharifynia@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۰/۳/۲۲

تاریخ دریافت: ۸۹/۷/۲۸

چکیده

زمینه و هدف: ولوواژینیت کاندیدیایی (Vulvovaginal candidiasis) بیماری شایع زنان است که در اثر رشد غیر طبیعی کاندیداها در مخاط دستگاه تناسلی زنان ایجاد می‌شود. علائم و نشانه‌های بالینی ولوواژینیت کاندیدیایی اغلب غیر اختصاصی است؛ بنابراین تشخیص بیماری بر اساس آن‌ها قطعی نیست. هدف از این پژوهش ارزیابی ارزش روش‌های تشخیصی سرولوژیک ایمنوفلورسانس غیر مستقیم و الیزا در مقایسه با آزمایش مستقیم و کشت در بیماران مبتلا به ولوواژینیت کاندیدیایی بود.

روش کار: این مطالعه یک روش توصیفی-مقایسه‌ای بود که بر روی ۸۷ بیمار مشکوک به ولوواژینیت کاندیدیایی و ۵۰ نفر از افراد سالم (گروه کنترل) انجام شد. نمونه‌ها مورد آزمایش مستقیم، کشت و آزمایش‌های تکمیلی برای شناسایی گونه‌های مختلف کاندیدا قرار گرفتند. سپس با استفاده از سرم بیماران تست‌های سرولوژیک شامل ایمنوفلورسانس غیر مستقیم و الیزا انجام گرفت. برای مقایسه متغیرهای کمی و کیفی به ترتیب از آزمون‌های chi-square، t-student و در صورت لزوم آزمون دقیق فیشر استفاده شد.

یافته‌ها: از ۸۷ نمونه مشکوک به ولوواژینیت کاندیدیایی در مجموع ۵۰ مورد ولوواژینیت کاندیدیایی تشخیص داده شد. عوامل مسبب به ترتیب فراوانی عبارت بودند از: کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا کفایر، کاندیدا اینکونسیپکوا و کاندیدا فاماتا. هم چنین کاندیداها جدا شده از افراد کنترل به ترتیب فراوانی عبارت بودند از: کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا گلابراتا و کاندیدا کفایر. در این بررسی، تمام گروه کنترل در تست ایمنوفلورسانس غیرمستقیم منفی و در گروه بیماران ۴۲ نفر (۸۴٪) مثبت و ۸ نفر (۱۶٪) منفی بودند. با روش الیزا، همه گروه کنترل منفی و در گروه بیماران ۴۰ نفر (۸۰٪) در این تست مثبت و ۱۰ نفر (۲۰٪) منفی شدند.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد در مواردی که امکان انجام روش‌های مستقیم میکروسکوپی و کشت وجود نداشته باشد، روش‌های ایمنوفلورسانس غیرمستقیم و الیزا می‌توانند به عنوان روش‌های جایگزین در تشخیص ولوواژینیت کاندیدیایی مطرح باشند.

کلید واژه‌ها: ولوواژینیت کاندیدیایی، روش‌های تشخیصی، ایمنوفلورسانس غیر مستقیم، الیزا.

مقدمه

ناحیه واژن است که اغلب در طول دوره قبل از قاعدگی شدیدتر می‌شود^(۱،۲). این بیماری با ترشحات زرد شیری، غلیظ و غشا کاذب خاکستری در سطح مخاط واژن همراه است^(۳). میزان ترشحات در بیماران مختلف، متفاوت است و معمولاً ترشحات به صورت تکه‌های سفید و پنیری شکل دیده می‌شود^(۴،۵).

ولوواژینیت کاندیدیایی بیماری است که در اثر رشد غیر طبیعی مخمرها در مخاط دستگاه تناسلی زنان ایجاد می‌شود. این بیماری یکی از مشکلات زنان در سنین باروری می‌باشد^(۱). اگر چه علائم و نشانه‌های ولوواژینیت کاندیدیایی معمولاً غیراختصاصی می‌باشد، اما شایع‌ترین علامت خارش

اصلی را در دفاع کاندیدیازیس سیستمیک بازی می‌کنند، در حالی که ایمنی سلولی (CMI=Cell-mediated immunity) در سطوح مخاطی بیشتر نقش دارد^(۱۵و۱۶). تحقیقات انجام شده نشان می‌دهد که لنفوسیت‌ها CMI موضعی مهم‌ترین نقش دفاعی را بر علیه واژینیت بازی می‌کنند^(۱۷). طبق مطالعات انجام شده توسط Fidel در سال ۱۹۹۵ به نظر می‌رسد، CMI سیستمیک نقش محافظتی بر علیه واژینیت‌های کاندیدیایی ندارد^(۱۸).

در واژینیت کاندیدیایی، کموکائین‌هایی مانند Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP1) و Macrophage Inflammatory Protein 2 (MIP2) در ترشحات واژن افزایش پیدا می‌کنند. Th1, Th2 موضعی نیز در ترشحات واژن زیاد می‌شوند و سبب افزایش TGF بتا می‌شوند. در حالی که سایر سایتوکاین‌ها مانند IFN- γ , IL2, IL4, IL12 افزایش چشمگیری ندارند. تحقیقات انجام شده روی رت نشان می‌دهد، CD+8T-cell در ترشحات واژن افزایش پیدا می‌کند. در ادامه میزان سایتوکاین در Th1 مانند IL2 (Interleukin 2), IL12 (Interleukin 12) و INF اینترفرون گاما بالا می‌رود. با افزایش این سایتوکاین‌ها لنفوسیت نیز در محل عفونت تجمع می‌یابند^(۱۸).

در ترشحات واژن خانم‌های مبتلا به VVC سایتوکاین‌های Th1, Th2 وجود دارند. در حالی که در افراد سالم فقط سایتوکاین‌های Th1 وجود دارند که ممکن است به دلیل دفاع بر علیه فلور نرمال کاندیدای موجود در واژن تولید شده باشند. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد در ترشحات واژن و سرم خانم‌های مبتلا به واژینیت عودکننده کاندیدیایی (Recurrent Vulvovaginal candidiasis (RVVC)، پروتئین‌های حاصل از شوک حرارتی وجود دارد که سبب کاهش Th1 موضعی در واژن می‌شود و باعث می‌شود استعداد ابتلا به RVVC در این افراد افزایش یابد^(۱۷). هم‌چنین در بعضی از افراد مبتلا به RVVC، IgE (Immunoglobulin E) ضد کاندیدا در ترشحات واژن افزایش پیدا می‌کند، در حالی که

pH واژن در این بیماری معمولاً نرمال بوده (۴/۵-۴) و بیماران معمولاً از بوی نامطبوع شاکی نیستند^(۲).

هفتاد و پنج درصد زنان در طول زندگی خود حداقل یک بار دچار ولوواژینیتی می‌شوند و ۴۰-۵۰٪ زنان بیش از یک بار به این بیماری مبتلا می‌شوند و در ۱۰-۵٪ زنان این بیماری به صورت عودکننده در می‌آید^(۱و۲و۸).

عامل این بیماری، گونه‌های مختلف کاندیدا بوده که کاندیدا آلبیکنس، شایع‌ترین و عامل ۸۰-۹۰٪ موارد بیماری است. دومین گونه شایع، کاندیدا گلابراتا است که ۵-۱۵٪ موارد را به خود اختصاص می‌دهد^(۱و۹). گونه‌های دیگر مانند کاندیدا تروپیکالیس و کاندیدا کروزی می‌توانند در ۵٪ موارد عامل ایجاد کننده واژینیت باشند^(۱۰). تشخیص بیماری با جداسازی قارچ از کشت به همراه مشاهده سلول‌های مخمری جوانه دار، میسلیوم‌های کاذب و حقیقی انجام می‌شود. شکل مشخص حالت تهاجمی کاندیدا شامل مخمرهای جوانه دار و میسلیوم کاذب منشعب و تولید بلاستوسپور است^(۴).

ایمنی در ولوواژینیت کاندیدیایی

اولین سد دفاعی در برابر میکروارگانیسم‌ها، پوست و نواحی مخاطی می‌باشند که دارای مواد ضد میکروبی هستند. این مواد توسط سلول‌های اپی تلیال و اندوتلیال تولید می‌شوند. هم‌چنین آن‌ها دارای میکروفلورهای از ارگانیسم‌های ساپروفیت (saprophyte) هستند که مانع از تجمع میکروارگانیسم‌های دیگر می‌شوند^(۱۱).

ایمنی سلولی در دفاع علیه کاندیدا در نواحی جلدی مخاطی نقش اصلی را ایفا می‌کند^(۱۲).

در یک فرد نرمال، نوتروفیل‌ها، مونوسیت‌ها و T سل‌های CD8+, CD4+ در دفاع علیه عفونت‌های مخاطی با یکدیگر همکاری می‌کنند^(۱۳و۱۴).

ایمنی ذاتی، ایمنی همورال (Humoral) و ایمنی سلولی هر سه بر علیه عفونت‌های کاندیدا آلبیکنس وارد عمل می‌شوند. ایمنی ذاتی توسط لکوسیت‌های پلی مورفونوکلئار (PMN=Polymorphonuclear neutrophil) و ماکروفاژها ایجاد می‌شود که نقش

سادگی روش الایزا به همراه حساسیت و تنوع آن، سبب شده است که این روش در تشخیص بیماری‌های قارچی به طور وسیعی مورد استفاده قرار گیرد. روش الایزا برای شناسایی آنتی بادی ضد کاندیدا در سال ۱۹۷۶ شرح داده شد که هم خوانی بسیار خوبی با روش ایمونوفلورسانس و ایمونوالکتروفورز داشت^(۲۳).

هدف این پژوهش ارزیابی ارزش روش‌های تشخیص سرولوژیک ایمونوفلورسانس غیر مستقیم و الایزا در مقایسه با آزمایش مستقیم و کشت در تشخیص ولوواژینیت کاندیدیایی بود.

روش کار

این مطالعه یک روش توصیفی-مقایسه‌ای بود. محل نمونه برداری بخش زنان و زایمان بیمارستان لولاگر انتخاب شد و از بیمارانی که از علایم بالینی مانند سوزش، خارش، ترشح پنیری، درد، قرمزی شکایت داشتند، تحت نظر پزشک متخصص زنان و زایمان نمونه برداری به عمل آمد که روش جمع‌آوری نمونه به صورت غیر احتمالی و در دسترس (تصادفی) بود.

برای نمونه برداری از افراد مورد آزمایش، توسط پزشک اسپکولوم استریل مرطوب شده با آب مقطر استریل درون واژن گذاشته شده و با وارد کردن دوسواب استریل به طور همزمان از بن بست خلفی واژن که محل تجمع ترشحات می‌باشد برداشت می‌شد. سواب‌ها در لوله‌های حاوی یک میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل قرار داده شده و به آزمایشگاه قارچ شناسی منتقل می‌شدند.

بدین ترتیب از ۸۷ بیمار مشکوک به ولوواژینیت کاندیدیایی و ۵۰ نفر از افراد سالم که فاقد علایم سوزش و خارش بودند نمونه‌گیری به عمل آمد تا مقایسه‌ای میان تیتراژ آنتی بادی بین افراد سالم و بیمار انجام شود؛ و همچنین ۵cc خون وریدی لخته از هر کدام از بیماران و افراد کنترل تهیه و به آزمایشگاه منتقل گردید. در آزمایشگاه نمونه‌ها مورد آزمایش مستقیم، با استفاده از پتاس ۱۰٪ قرار گرفتند. سپس کشت روی محیط کاندیدا کروم آگار انجام شد که برای انجام کشت از لوپ استاندارد ۰/۰۱ میلی لیتر میکروبیولوژی استفاده شد. پس از

Immunoglobulin), IgA (Immunoglobulin A) IgG (G موجود در ترشحات، تفاوتی با افراد سالم نشان نمی‌دهد^(۱۸).

تست‌های سرولوژیک

برای تشخیص عامل بیماری می‌توان از آنتی سرم اختصاصی و تست‌های سرولوژیکی استفاده کرد^(۱۹). از آن جایی که قارچ‌ها دارای ساختمان و تشکیلات پیچیده سیتوپلاسمی هستند، اغلب محصولات عصاره سلولی آن‌ها ایمونوژنیک بوده و در افراد مبتلا ایجاد آنتی بادی می‌کنند که انجام تست‌های سرولوژیکی را امکان پذیر می‌نماید. این تست‌ها دارای ارزش فوق‌العاده‌ای در تشخیص و پیگیری روند بیماری‌های سیستمیک هستند^(۴). روش الایزا برای شناسایی و تعیین عیار آنتی بادی اختصاصی در نمونه‌های سرم کاربرد وسیع دارد. ویژگی این روش مستقیماً به درجه خلوص آنتی ژن متصل شده به فاز جامد وابسته است^(۲۰).

در حال حاضر تست‌های گوناگونی مانند ایمونوفلورسانس غیر مستقیم و کانتر ایمونوالکتروفورز جهت تشخیص کاندیدایزیس در بسیاری از بیمارستان‌های اروپا انجام می‌گیرد^(۲۱). براساس مطالعه‌ای بر روی ۵۰ نفر از مبتلایان به ولوواژینیت کاندیدیایی انجام شد، سطح آنتی بادی‌های ضد کاندیدا با روش الایزا محاسبه گردید و حساسیت این روش ۷۷/۵٪ و اختصاصی بودن آن ۹۰٪ گزارش شد^(۲۲).

روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم به طور گسترده در ردیابی آنتی بادی‌های ضد کاندیدآلبیکنس مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این روش از بلاستوکونیدیا به عنوان آنتی ژن استفاده می‌شود. در تست ایمونوفلورسانس غیر مستقیم، ایموگلوبولین‌های کلاس IgA, IgG, IgM قابل ردیابی هستند که در این میان IgG از همه مهم‌تر است. سطح ارزشمند IgG در ۷۸٪ بیماران مبتلا به کاندیدایزیس مشاهده شده، در حالی که سطح ارزشمند IgA, IgM در ۳۰-۵۱٪ بیماران مبتلا به کاندیدایزیس مشاهده شده است^(۲۳).

گذشت ۴۸ ساعت کشت‌ها بررسی شدند و رنگ و مشخصات کلونی‌ها یادداشت شد. سپس شمارش کلونی انجام شد. پلیت‌هایی که حاوی تعداد کلونی بیش از ۱۰۰۰ عدد در ۱ میلی لیتر بودند به عنوان نمونه بیمار تلقی شدند. برای شناسایی گونه‌های مختلف کاندیدا روی کلونی‌های جدا شده، آزمایش‌های تکمیلی از قبیل توانایی تولید کلامیدو کونیدی در محیط کورن میل آگار حاوی توئین ۸۰، تولید لوله زایا (germ tube test)، بررسی حساسیت به سیکلوهاگزاماید و آزمایش جذب قندها با استفاده از کیت (API20C) انجام شد.^(۱۲) در این پژوهش تست‌های سرولوژیکی ایمنوفلورسانس غیر مستقیم و الایزا انجام پذیرفت.

روش ایمنوفلورسانس غیرمستقیم به ترتیب زیر انجام گرفت:

۱- آماده سازی مخمر: در این بررسی از کاندیدا آلبیکنس شماره ۱۰۲۶۱ ATCC که در محیط سابورواس کشت داده شده بود، استفاده شد. سپس لوله محتوی مخمر ۳ مرتبه با سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده شد. بعد لوله با فرمالین ۲٪ پر شد و به مدت یک شب در حرارت اتاق قرار داده شد تا مخمرها غیرفعال و ثابت شوند. برای حصول اطمینان از غیرفعال بودن ارگانسیم یک لوپ از مخمر روی محیط سابوروگلوکز آگار کشت داده شد. برای خارج کردن فرمالین از محیط کار ۳ مرتبه با سرم فیزیولوژی شستشو داده شد. سپس مخمر غیرفعال شده، در آب مقطر استریل غوطه‌ور و با شمارش بر روی لام نئوبار یک سوسپانسیون مخمری با 10^6 سلول بر میلی لیتر تهیه شد.^(۲۴) از سوسپانسیون تهیه شده به عنوان آنتی ژن در این تست استفاده شد.

۴- تهیه کنترل‌های مثبت و منفی: کنترل مثبت شامل سرمی است که حاوی آنتی بادی اختصاصی ضد کاندیدا باشد و کنترل منفی شامل سرمی است که فاقد این آنتی بادی باشد.^(۲۴)

۵- تهیه رقت‌های سرمی: از سرم بیماران رقت‌های ۱/۵۰ تا ۱/۱۲۸۰۰ تهیه و به صورت دوپل درون خانه‌های لام ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه در محفظه مرطوب انکوبه شدند.^(۲۴)

۶- شستشو: لام‌ها ۳ مرتبه و هر مرتبه ۵ دقیقه با بافر PBS ($pH=7.4$) شستشو داده شدند.^(۲۴)

۷- تهیه رقت اوانس بلو (ماده رنگی): در این مرحله اوانس بلو با بافر (Phosphate buffered PBS=saline) به نسبت یک به صد رقیق شد و بعد ۰/۸ میلی لیتر از این سوسپانسیون به ۱۰ میکرولیتر AHG اضافه شد تا رقت ۱/۸۰ از کونژوگه به دست آید. اوانس بلو در این جا به عنوان رنگ زمینه به کار رفت.^(۲۴)

۸- افزودن اوانس بلو: روی هر خانه از لام IF یک قطره (۱۰ لاند) از سوسپانسیون فوق اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در محفظه مرطوب انکوبه شد.^(۲۴)

۹- شستشو: لام‌ها ۳ مرتبه و هر مرتبه ۵ دقیقه با بافر PBS شستشو داده شدند. پس از خشک شدن لام‌ها به هر خانه یک قطره گلیسرول که با بافر PBS به میزان ۹ به ۱ رقیق شده بود اضافه گردید.^(۲۴)

۱۰- بررسی میکروسکوپی: لامل 24×50 روی لام‌ها قرار گرفت و زیر میکروسکوپ فلورسنت با عدسی ۴۰ مورد مطالعه قرار گرفت. برای خواندن نتایج ابتدا کنترل‌های مثبت و منفی بررسی شدند تا وجود واکنش مثبت و منفی مشخص و تایید شود. نمونه مثبت خانه‌ای است که در آن دیواره سلول مخمری به رنگ سبز درخشان دیده شود و با افزایش میزان رقت سرم رنگ حاصله کم رنگ‌تر

۲- تهیه لام‌های ایمنوفلورسانس: از سوسپانسیون مخمری تهیه شده در بند شماره ۱ به عنوان آنتی‌ژن در این تست استفاده شد و در هر خانه یک قطره از سوسپانسیون مزبور (معادل ۱۰ میکرولیتر) ریخته و در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد تا خشک شود.^(۲۴)

۳- آماده سازی رقت آنتی هیومن گلوبولین کونژوگه (Conjugated) توتال: در این جا از Anti-Human IgA, IgG, IgM, kappa,

جدول شماره ۱- تیتراژ آنتی بادی به دست آمده با روش ایمنوفلورسانس غیر مستقیم در بیماران و افراد کنترل

p-value	کل		گروه کنترل		افراد بیمار		تیتراژ آنتی بادی با روش IFA
	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	
<0/001	۳	۳	۶	۳	۰	۰	۱:۱۰۰
	۲۰	۲۰	۴۰	۲۰	۰	۰	۱:۲۰۰
	۳۵	۳۵	۵۴	۲۷	۱۶	۸	۱:۴۰۰
	۱۳	۱۳	۰	۰	۲۶	۱۳	۱:۸۰۰
	۲۲	۲۲	۰	۰	۴۴	۲۲	۱:۱۶۰۰
	۷	۷	۰	۰	۱۴	۷	۱:۳۲۰۰

جدول شماره ۲- مقایسه نتایج حاصل از ایمنوفلورسانس غیرمستقیم با کشت

ایمنوفلورسانس غیر مستقیم	کشت		منفی		مثبت		کل
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
منفی	۵۰	۵۰٪	۸	۸٪	۵۸		
مثبت	۰	۰٪	۴۲	۴۲٪	۴۲		
جمع	۵۰	۵۰٪	۵۰	۵۰٪	۱۰۰		

ایمنوفلورسانس غیر مستقیم از تحلیل منحنی ROC و شاخص (Sensitivity Youden + Specificity-1) استفاده شد. در این بررسی کشت به عنوان استاندارد طلایی در نظر گرفته شد و نقطه ۱/۶۰۰ به دلیل این که دارای بیشترین شاخص Youden بود به عنوان بهترین نقطه Cut off تعیین گردید. ارزش تشخیصی این روش و دو روش الایزا و مستقیم میکروسکوپی به وسیله شاخص‌های حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی مورد بررسی قرار گرفت. هم چنین توافق بین روش‌ها به وسیله شاخص کاپا بررسی شد.

یافته‌ها

در مجموع از ۸۷ فرد مشکوک به ولوواژینیت که دارای علائم سوزش و خارش و ترشح بودند و ۵۰ نفر از افراد سالم که فاقد این علائم بودند نمونه برداری شد. از میان ۸۷ فرد مشکوک ۵۰ مورد ولوواژینیت کاندیدیایی تشخیص داده شد که عوامل آن به ترتیب درصد فراوانی عبارت بودند از: کاندیدا آلبیکنس (۶۲٪)، کاندیدا گلابراتا (۱۸/۶٪)، کاندیدا کفایر (۱۰/۱٪)، کاندیدا اینکوسپیکوا (۶/۷٪) و کاندیدا فاماتا (۱/۷٪).

در مقایسه نتایج آزمایش مستقیم و الایزا میان

خواهد شد. آخرین تیتراژ سرمی که دارای واکنش مثبت باشد، به عنوان تیتراژ نهایی یادداشت شد. واکنش منفی شامل سلول‌هایی است که به رنگ آبی یا بنفش مایل به قرمز دیده می‌شود. برای انجام تست الایزا، از کیت‌هایی که از شرکت r-biopharm خریداری شد با مشخصات زیر استفاده شد.

RIDA SCREEN Candida IgG (K9021)

RIDA SCREEN Candida IgM (K9031)

RIDA SCREEN Candida IgA (K9011)

شیوه کار در تست الایزا، طبق دستورالعمل ارائه شده توسط کارخانه سازنده که همراه کیت موجود بود، انجام گرفت. تمامی متغیرهای کمی به صورت میانگین و انحراف معیار و متغیرهای کیفی به صورت تعداد (درصد) بیان شدند. برای مقایسه متغیرهای کمی در دو گروه مورد و شاهد، ابتدا نرمال بودن متغیرها به وسیله آزمون کولموگروف اسمیرنف و نمودار Q-QNormal و نمودار جعبه ای مورد بررسی قرار گرفتند و در صورت نرمال بودن متغیر، از آزمون t-student برای مقایسه استفاده شد. در غیر این صورت از آزمون ناپارامتری من-ویتنی برای مقایسه دو گروه استفاده شد.

برای یافتن بهترین نقطه برش (Cut off) برای

جدول شماره ۳- بررسی نتایج حاصل از روش مستقیم میکروسکوپی و الایزا در افراد بیمار و گروه کنترل

p-value	کل	گروه کنترل	افراد بیمار	روش مستقیم میکروسکوپی
<۰/۰۰۱	تعداد درصد	تعداد درصد	تعداد درصد	
	۴۴ ۴۴	۰ ۰	۸۸ ۴۴	مثبت
	۵۶ ۵۶	۱۰۰ ۵۰	۱۲ ۶	منفی
p-value	کل	گروه کنترل	افراد بیمار	ELISA
<۰/۰۰۱	تعداد درصد	تعداد درصد	تعداد درصد	
	۴۰ ۴۰	۰ ۰	۸۰ ۴۰	مثبت
	۶۰ ۶۰	۵۰ ۵۰	۲۰ ۱۰	منفی

جدول شماره ۴ - توزیع میانگین و انحراف معیار تیترهای آنتی بادی بر علیه گونه‌های کاندیدا با روش الایزا

p-value	کل	گروه کنترل	افراد بیمار	
انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار
۰/۰۳۱	۹/۳۶	۱۱/۴	۹/۹۴	۱۲/۰۲
۰/۰۰۱<	۴/۸۹	۶/۶۹	۱/۳۹	۳/۵۶
۰/۶۸۳	۲/۵۰	۵/۲۰	۲/۵۲	۵/۳۱

جدول شماره ۵ - ارزش تشخیصی روش‌های مختلف نسبت به روش کشت

نام روش	حساسیت(درصد)	ویژگی(درصد)	ارزش اخباری مثبت(درصد)	ارزش اخباری منفی(درصد)	کاپا
مستقیم میکروسکوپی	۸۸	۱۰۰	۱۰۰	۸۹/۳	۰/۸۸۰
الایزا	۸۰	۱۰۰	۱۰۰	۸۳/۳	۰/۸۰۰
ایمونوفلورسانس غیرمستقیم	۸۴	۱۰۰	۱۰۰	۸۵/۷	۰/۸۶۰

بحث و نتیجه‌گیری

ولوواژینیت کاندیدیایی یکی از شایع‌ترین بیماری‌های قارچی زنان و علت مراجعات مکرر آنان به کلینیک است که باعث تحمیل هزینه‌های درمانی برای بیماران می‌گردد. تشخیص به موقع بیماری می‌تواند از صرف هزینه‌های درمانی و مراجعات مکرر بیماران بکاهد.

در بررسی انجام شده از ۸۷ نفر بیمارانی که درمعاینات بالینی به عنوان مبتلایان به واژینیت کاندیدیایی تشخیص داده شده بودند، فقط ۵۰ نفر (۵۷/۴۷٪) آن‌ها در روش کشت که روش استاندارد طلایی در این پژوهش می‌باشد مثبت و ۳۷ نفر (۴۲/۵٪) از آن‌ها منفی شدند و این نشان دهنده این واقعیت است که صرفاً از علایم بالینی نمی‌توان جهت تشخیص ولوواژینیت کاندیدیایی استفاده کرد. عرف درمان توأم باکتریایی و قارچی از روی علایم کلینیکی توسط پزشک در مواردی که

گروه کنترل و بیمار اختلاف معنی‌دار به دست آمد. ($p < 0.01$)

در مقایسه تیترهای بدست آمده با روش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم میان افراد کنترل و بیمار اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ($p < 0.01$). در این بررسی همه افرادی که نتیجه کشت آن‌ها روی محیط کاندیدا کروم آگار منفی بود (افراد سالم) در تست ایمونوفلورسانس نیز منفی شدند. اما در گروه افراد بیمار که از نظر کشت مثبت بودند، ۸ نفر در تست ایمونوفلورسانس منفی و ۴۲ نفر مثبت شدند.

در مقایسه میانگین سطوح آنتی‌بادی‌های کلاس IgM و IgG میان گروه کنترل و افراد بیمار اختلاف معنی‌دار بود؛ در حالی که در مورد کلاس IgA این اختلاف معنی‌دار نبود.

در مطالعه دیگری، از ۲۱۵ خانمی که کشت ترشحات آن‌ها از نظر کاندیدا مثبت بود، فقط ۱۶۷ مورد (۷۷/۶٪) در آزمایش مستقیم میکروسکوپی مثبت شدند، که با مطالعه حاضر مطابقت دارد^(۶).

اختلاف معنی دار نتایج ایمونوفلورسانس غیر مستقیم میان گروه کنترل و بیمار، نشان دهنده تفاوت سطح آنتی بادی‌های سرمی در این دو گروه می‌باشد. (جدول شماره ۱).

در این بررسی، برای یافتن بهترین نقطه برش (cut off) از منحنی ROC استفاده شد که تیتراژ ۱/۶۰۰ به عنوان بهترین نقطه برش انتخاب شد و تیتراژهای بالاتر از ۱/۶۰۰ جزء موارد مثبت تلقی شدند. با توجه به نقطه برش در ایمونوفلورسانس غیر مستقیم در این بررسی، در ۸٪ موارد ممکن است نتیجه مثبت کاذب به دست آید (جدول شماره ۲ در یافته‌ها).

در مطالعه‌ای در سال ۱۹۷۲ انجام گرفت، سطح آنتی بادی‌های ضد کاندیدا در ۷۰-۸۹ درصد از بیماران مبتلا به کاندیدیازیس قابل ارزیابی بود که با مطالعه حاضر هم خوانی دارد^(۹).

در مطالعه‌ای دیگر، تیتراژ آنتی‌بادی در گروه کنترل حداکثر ۱/۱۶ و در بیماران مبتلا به ولوواژینیت کاندیدیایی، ۱/۳۲ و بالاتر گزارش شد^(۳۰).

مقایسه نتیجه به دست آمده از این مطالعه و مطالعه حاضر تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین تیتراژهای مثبت و منفی را نشان می‌دهد و به نظر می‌رسد یکی از دلایل مهم این مسئله بالا بودن تیتراژ سرواپیدمیولوژیک در جامعه مورد مطالعه است.

در ضمن در تحقیقی دیگر، تیتراژهای بالاتر از ۱/۶۴ در بیماران مبتلا به کاندیدیازیس، مثبت تلقی شد^(۲۹).

نتیجه این بررسی‌ها نشان می‌دهد، در مطالعات مختلف، تیتراژ برش متفاوت بوده و این موید اختلاف تیتراژ آنتی‌بادی ضد کاندیدا در نقاط مختلف است. بنابراین ضرورت دارد هر منطقه، در هنگام راهاندازی این تکنیک برای خود یک نقطه برش جداگانه شود.

در این بررسی با روش الایزا، سطح آنتی بادی‌های کلاس IgG, IgA, IgM در گروه بیماران و افراد کنترل اندازه‌گیری شد. جدول شماره ۳ نشان

آزمایشگاه در دسترس نیست، نیز دلیل بر صحت این مدعاست. هم چنین گزارش یافته‌های نوویکوا و مارچ در سال ۲۰۰۲ بر روی ۸۳ بیمار مشکوک به واژینیت کاندیدیایی نیز این ادعا را تایید می‌کند^(۲۵).

نتایج یافته‌های تحقیقی در سال ۱۳۸۷ بر روی ۱۵۰ نمونه مشکوک به واژینیت کاندیدیایی با نتایج حاصل از این پژوهش مطابقت داشته و آن را تایید می‌نماید^(۲۶).

نتایج بررسی حاضر و بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد که تشخیص و درمان براساس معیارهای بالینی کافی نبوده و تشخیص‌های پاراکلینیک ضرورت دارد.

در مطالعه حاضر، روی هم رفته ۵ گونه متفاوت کاندیدا از نمونه‌های بیماران جدا گردید که به ترتیب عبارت بودند از کاندیدا آلبیکنس ۳۷ مورد (۶۲٪)، کاندیدا گلابراتا ۱۱ مورد (۱۸/۶٪)، کاندیدا کفایر ۶ مورد (۱۰/۱٪)، کاندیدا اینکونسپیکوا ۴ مورد (۶/۷٪) و کاندیدا فاماتا ۱ مورد (۱/۷٪). در این بررسی گونه غالب کاندیدا آلبیکنس و بعد از آن کاندیدا گلابراتا بود، که با چندین مطالعه پیشین هم خوانی داشت^(۲۶، ۲۷).

در مطالعه حاضر، از میان ۵۰ مورد واژینیت کاندیدیایی، ۹ مورد (۱۸٪) عفونت آمیخته با دو نوع کاندیدا شناخته شد که ۶ مورد از آن‌ها (۶۶/۶٪) کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا به صورت توأم عامل ایجاد عفونت بودند که با تحقیق Richter و همکاران مطابقت دارد^(۲۸).

مقایسه نتایج آزمایش مستقیم میکروسکوپی و کشت نشان دهنده مطابقت نتایج کشت با آزمایش مستقیم بوده و فقط در ۶ مورد (۱۲٪) از موارد کشت‌های مثبت، آزمایش مستقیم میکروسکوپی منفی شد.

در مطالعه‌ای ۳۳/۳٪ زنانی که دچار ولوواژینیت کاندیدیایی بودند، در آزمایش مستقیم میکروسکوپی منفی شدند که نتیجه این مطالعه با نتیجه تحقیق حاضر هم خوانی ندارد^(۱۰). این تفاوت ممکن است مربوط به شرایط بهداشتی و اجتماعی جامعه باشد.

الایزا بیشتر است، ولی ظاهر امر دلالت بر این مدعا دارد.

جدول شماره ۵، ارزش تشخیصی روش‌های ایمنوفلورسانس غیر مستقیم، الایزا و آزمایش مستقیم میکروسکوپی را نسبت به کشت نشان می‌دهد. با توجه به بحث فوق می‌توانیم نتایج زیر را اعلام کنیم:

■ روش ایمنوفلورسانس غیر مستقیم در مقایسه با الایزا تفاوت قابل ملاحظه‌ای ندارد.

■ چون در روش‌های سرولوژی گونه کاندیدا قابل تشخیص نیست، لذا روش‌های کشت و مستقیم میکروسکوپی هنوز هم به عنوان روش‌های گلد استاندارد و قطعی مطرح است.

■ روش‌های غیر مستقیم نظیر ایمنوفلورسانس و الایزا، به عنوان روش‌هایی هستند که در مواردی که به هر علتی (به طور مثال نمونه برداری پس از استفاده از داروهای ضد قارچی و یا خود درمانی بیمار) نتوانیم نتایج مطلوبی از روش‌های مستقیم و کشت به دست آوریم، این روش‌ها می‌توانند به عنوان روش‌های جایگزین مطرح باشند.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان نامه خانم مینا شریفی سرخریزی در مقطع کارشناسی ارشد به راهنمایی دکتر مهربان فلاحتی و دکتر فرید هزینی در سال ۱۳۸۹ و کد ۸۸۲/۱ می‌باشد که با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی تهران اجرا شده است.

منابع

1. Ferrer J. Vaginal Candidosis: epidemiological and etiological factors, International Journal of gynecology and obstetrics. 2000.(71):21-27.
2. Sobel Jack. Genital candidiasis. School. 2005.(33):62-65.
3. Odd S.F.C, Webster C.E, Mayuranathan. P, simmons. P.D. Candida concentrations in the vaginal and their association with signs and symptoms of vaginal candidiasis, Journal of Medical and Veterinary Mycology. 1998.(26): 277-283.
4. Zaini F, Mehbood ASA Emami M. [Comprehensive Medical Mycology]. University of Tehran Press. Second ed. 1383. (512)333-341. (Persian).

می‌دهد که سطح آنتی بادی‌های کلاس IgA, IgM, IgG در همه افراد کنترل منفی می‌باشد که دور از انتظار نیست. در گروه بیماران مبتلا به ولوواژینیت کاندیدیایی، ۴۰ نفر (۸۰٪) در این تست مثبت و ۱۰ نفر (۲۰٪) منفی شدند. به‌طوری‌که میانگین سطح IgM در افراد بیمار ۱۳/۱۵ و در گروه کنترل ۹/۱۳ بود که براساس محاسبات آماری بین این دو گروه اختلاف معنی دار بود ($p=0/031$).

میانگین سطح IgG در گروه بیماران ۹/۸۳ و در گروه کنترل ۳/۵۶ بود و در مقایسه بین این دو گروه نیز اختلاف معنی دار بود ($p<0/01$).

در صورتی‌که در مقایسه میانگین‌های سطوح IgA در گروه بیماران و افراد کنترل اختلاف معنی دار نبود ($p=0/683$) (جدول شماره ۴).

در مطالعه‌ای که ۱۹۷۶ انجام شد، هیچ IgA ترشحاتی ضد کاندیدا آلیکس در سرم افراد مبتلا به ولوواژینیت کاندیدیایی به دست نیامد، که با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد^(۳۰).

براساس تحقیقی دیگر که بر روی ۵۰ نفر از مبتلایان به ولوواژینیت کاندیدیایی انجام شدو سطح آنتی بادی‌های ضد کاندیدا با روش الایزا محاسبه گردید، حساسیت این روش ۷۷/۵٪ و اختصاصیت آن ۹۰٪ گزارش شد^(۳۲).

در مقایسه میان دو روش الایزا و ایمنوفلورسانس غیر مستقیم از میان ۵۰ نفر مبتلا به ولوواژینیت کاندیدیایی، ۱۰ نفر (۲۰٪) در روش الایزا و در روش ایمنوفلورسانس غیر مستقیم ۸ نفر (۱۶٪) منفی شدند.

با توجه به نتایج الایزا در این بررسی و مراجعه به نوشته‌های موجود، این تست در تشخیص ولوواژینیت کاندیدیایی سودمند ارزیابی می‌شود. این مقایسه نشان می‌دهد:

۱- نتایج یافته‌های حاصل از الایزا و ایمنوفلورسانس در این پژوهش به هم نزدیک است.

۲- نظر به این که حجم نمونه در این پژوهش به حد کافی نبود، نمی‌توان این گونه نتیجه‌گیری کرد که حساسیت ایمنوفلورسانس غیر مستقیم از

19. Suzuki Shigeo. Serological Differences among the pathogenic *Candida* spp, Calderone Richard A, *Candida* and Candidiasis. ASM PRESS. USA. Washington D.C. first E.D. 2002. 29-35.
20. Jones GR, Warnock DW. Observations on the use of the double diffusion test in the diagnosis of vaginal candidiasis. *Journal of clinical pathology* 2010. (30):262-265.
21. Persat F, Topenot R, Piens M.A, Theibaut A, Dannaoui E, Picot S. Evaluation of different commercial ELISA methods for the serodiagnosis of systemic candidiasis 2002. (45):455-460.
22. Tan S.W, Mackay A, Warmington J.A. Serologic test for vulvovaginal Candidiasis, *International Journal of gynecology and obstetrics* 2003. (8):79-81.
23. Mackenzie Donald W.R, Serodiagnosis, Howard Dexter. H, *Fungi pathogenic for Humans and Animals (In three parts), part B pathogenicity and Detection*, Marcel Dekker, INC. New York, USA. 1983. 121-218.
24. Mackenzie Donald W.R. Serodiagnosis tests, Evans E. G.V, Richardson M.D. *Medical Mycology, A practical approach*, IRL Press, university of Glasgow, United Kingdom, first ed. 1989. 221-224.
25. Novikova N, March PA. Characterization of woman with a history of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2002 (81):1047-1052.
26. Falahati M., Sharifynia S., Foroumadi A., Bolouri F., Akhlaghy L., Yazdanparast A. et al. Drug resistance pattern in *Candida* species isolated from vaginitis. *Journal of Iran university of medical science*. 1388. (65):40-45. (Persian).
27. Kalkanci A., Kustimuy S., Bozdayi G., Biri A. Virulence factor and susceptibility patterns of *Candida* strains isolated from patients with vulvovaginal candidiasis. *Turk Microbiol Cem Derg*. 2003. (33):323-328.
28. Richter SS., Galask RP., Messer Sh A., Hollis RJ., Diekema DJ., Pfaller MA. Antifungal susceptibilities of *Candida* species causing vulvovaginitis and Epidemiology of Recurrent Cases. *Clinical Microbiology*. 2005. (43):2155-2162.
29. Mackenzie Donald W.R, Serodiagnosis, Howard Dexter. H, *Fungi pathogenic for Humans and Animals (In three parts), part B pathogenicity and Detection*, Marcel Dekker, INC, New York, USA, 1983, 121-218.
30. Warnock D.W, Hilton A.L., Value of the indirect immunofluorescence test in the diagnosis of vaginal candidiasis, Department of Microbiology and venereology. Bristol Royal Infirmary. 1976. (52):187-189.
5. Saravana B.P, Rajkumar R, Radhakrishnan S, Seenivasan C, Kannan S. Culture and Identification of *Candida albicans* from vaginal ulcer and separation of Enolase on SDS-PAGE. *International Journal of Biology*. 2010. (1) :84-93.
6. Anis Ahmad, Asad U. Khan. Prevalence of *Candida* species and potential risk factors for vulvovaginal Candidiasis in Aligarh, India. *European Journal of obstetrics and gynecology and reproductive biology*. 2009. (144):68-71.
7. Sobel J., Vulvovaginal Candidiasis. Department of medicine. Wayne state university .School of medicine. 2007. (71):1961-1971.
8. Johnson E., Berwald N. Diagnostic utility of physical examination, history and laboratory evaluation in emergency department patients with vaginal complaints. Department of Emergency Medicine. State university of New York. 2008. (52): 294-297.
9. Ventolini G. Recurrent vulvovaginal candidiasis. Department of obstetrics and gynecology of State university. 2006. (28):93-95.
10. Sobel Jack, Faro S., Foxman B. William J., Barbara D., Vulvovaginal Candidiasis: epidemiologic, diagnostic and therapeutic considerations. *American Journal of obstetrics and gynecology*. 1998. (2):203-211.
11. Blanco J.L., Garcia M.E. Immune response to fungal infections. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2008. (125): 47-70.
12. Wozniak KL, Wormley F.L, Fidel PL. *Candida* specific antibodies during experimental vaginal candidiasis in Mice. *Infection and Immunity*. 2002. (10):5790-5799.
13. Shoham Sh. Levitz S.M. The immune response to fungal infections. *British Journal of Haematology*. 2005. (129): 569-582.
14. Lopez -Ribot JL, Casanova M, Mauguie A, Martinez J.P. Antibody response to *Candida albicans* cell wall antigens. *Immunology and Medical Microbiology*. 2004. (41): 187-196.
15. Fidel PL. History and new insights into host defense against vaginal candidiasis. Department of Microbiology, Immunology and Parasitology. Louisiana State University .Health Sciences Center 2004. (5):220-227.
16. Novikova N, March PA. Characterization of woman with a history of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Acta obstet gynecol scand*. 2002. (81):1047-1052.
17. Nawrot U, Grzybek-Hryncewicz K, Zielska U, Czarny A, Podwinska J. The study of cell-mediated immune response in recurrent vulvovaginal candidiasis. *Immunology and Medical Microbiology*. 2000. (29):89-94.
18. Paul L, Fidel JR, Sobel JD. Host Defense against vaginal candidiasis, Calderone Richard A, *Candida* and candidiasis. ASM PRESS USA. Washington D.C. First E.D. 2002. 193-209.

Evaluation of serological diagnosis indirect immunofluorescence and ELISA in comparison to direct examination and culture in vulvovaginal candidiasis

Mina Sharifi Sorkherizi, MSc. in Mycology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. minasharifi@yahoo.com

***Mehraban Falahati, PhD.** Associate Professor of Mycology, Medicine Faculty, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. (*Corresponding Author). mehrabanfalahati@yahoo.com.

Farideh Zeini, PhD. Professor of Mycology, Health Faculty, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. fzaini@tums.ac.ir

Lame Akhlaghi, PhD. Associate Professor of Parasitology, Medicine Faculty, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. z_razi_lab@yahoo.com

Fariba Haydari-Kohan, MD. Gynecologist, Lolagar Hospital, Tehran, Iran. dr_heidarie@yahoo.com

Mohsen Ghelman, BSc. in Laboratory Sciences. Paramedicine Faculty, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. mohsen-ghelman@yahoo.com

Somayeh Sharifiniya, MSc. in Mycology, Medicine Faculty, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ssharifynia@yahoo.com

Abstract

Background: Vulvovaginal candidiasis occurs due to the overgrowth of candida in genital system mucosa of females. Symptoms and signs of vulvovaginal candidiasis are unspecific, therefore diagnosis is not certain. The aim of this research was comparison of the result of indirect immunofluorescence and ELISA with culture and direct microscopy examination in patients with vulvovaginal candidiasis.

Methods: This was a comparative-descriptive study performed on 87 patients and 50 normal cases as controls. All specimens were examined using direct microscopy, culturing and complimentary test to differentiate the candida species from each other. Serological tests such as indirect immunofluorescence and ELISA were performed on sera of the patients. To compare the quantitative and qualitative data, t-student test, chi-square and exact fisher test were used, if necessary.

Results: Out of 87 specimens, 50 cases were diagnosed as vulvovaginal candidiasis. The most frequent isolated pathogens were *C.albicans*, *C.glabrata*, *C.kefyr*, *C.inconspicua* and *C.famata*, respectively. Also, in control group, the most frequent pathogens were *C.albicans*, *C.glabrata* and *C.kefyr*, respectively. In this study all of normal cases were negative in indirect immunofluorescence test and in patients group 42 person (84%) were positive and 8 (16%) negative. Control participants were negative in ELISA and in patient group 40 person (80%) were positive and 10 person (20%) negative.

Conclusion: It seems in cases that direct microscopic and culturing methods is impossible, ELISA and indirect immunofluorescence can be used as an alternative method.

Keywords: Vulvovaginal candidiasis, Diagnosis tests, Indirect immunofluorescence ELISA.